

IMMUNE CHROMATOGRAPHY APPARATUS

Publication number: JP11108927 (A)

Publication date: 1999-04-23

Inventor(s): WADA TAKUYA; OBANA SATOSHI; KANEKO YUJI +

Applicant(s): SEKISUI CHEMICAL CO LTD +

Classification:

- **international:** G01N33/543; G01N33/543; (IPC1-7): G01N33/543

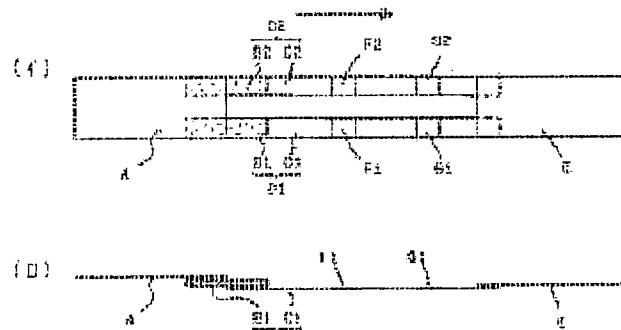
- **European:**

Application number: JP19970268907 19971001

Priority number(s): JP19970268907 19971001

Abstract of JP 11108927 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an immune chromatography apparatus capable of accurately and simply measuring a plurality of substances to be detected especially in a liquid to be examined at once. **SOLUTION:** This apparatus is constituted of an absorbing pad A for absorbing a liquid to be examined, and a developing route D of chromatography provided with conjugate pads (B1, B2) having visibly confirmable particles, to which substances immunologically bonded to substances to be detected in the liquid to be examined are bonded supported thereon in a dry state and porous chromatography members (C1, C2), to which substances (F1, F2) collecting the visibly confirmable particles are fixed through the substances to be detected in a contact state. The developing route D consists of a plurality of separately provided ones (D1, D2), and the absorbing pad A is in contact with the conjugate pads (B1, B2) in the respective developing routes (D1, D2).



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-108927

(43) 公開日 平成11年(1999)4月23日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 2 1

F I

C 0 1 N 33/543

5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数3 O.L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-268907

(22) 出願日 平成9年(1997)10月1日

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(72) 発明者 和田 拓也

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

(72) 発明者 尾花 敏

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

(72) 発明者 金子 裕司

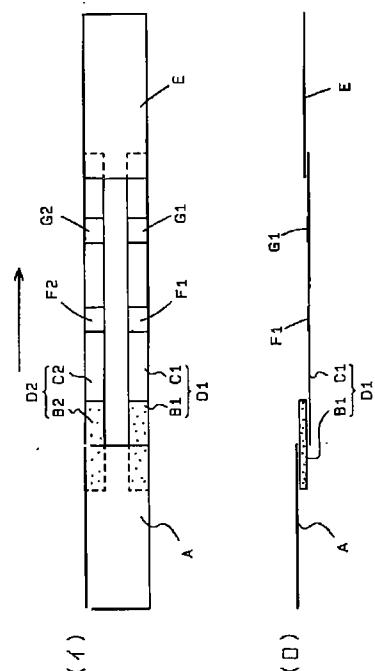
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫クロマトグラフィー装置

(57) 【要約】

【課題】 特に、被検液中の複数の検出目的物質を一度に正確かつ簡易に測定可能な免疫クロマトグラフィー装置を提供する。

【解決手段】 被検液を吸収するための吸収パッドA、並びに、被検液中の検出目的物質に免疫学的に結合する物質が結合された視認可能な粒子が乾燥担持されたコンジュゲートパッド(B1、B2)及び検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉する物質(F1、F2)が固定化された多孔性のクロマトグラフィー用部材(C1、C2)が接触されてなるクロマトグラフィーの展開経路Dから構成され、上記展開経路Dが複数個(D1、D2)別々に設けられており、吸収パッドAとそれぞれの展開経路(D1、D2)中のコンジュゲートパッド(B1、B2)が接触されていることを特徴とする免疫クロマトグラフィー装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検液を吸収するための吸収パッドA、並びに、被検液中の検出目的物質に免疫学的に結合する物質が結合された視認可能な粒子が乾燥担持されたコンジュゲートパッドB及び検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉する部位を有する多孔性のクロマトグラフィー用部材Cが接触されてなるクロマトグラフィーの展開経路Dから構成され、上記展開経路Dが複数個別々に設けられており、吸収パッドAとそれぞの展開経路D中のコンジュゲートパッドBが接触されていることを特徴とする免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項2】 更に、クロマトグラフィー用部材Cから被検液を吸収するための吸収パッドEが、クロマトグラフィー用部材Cに接触されて設けられていることを特徴とする請求項1記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項3】 上記構成部材の少なくとも一部を収容するハウジングが備えられていることを特徴とする請求項1又は2記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫クロマトグラフィー装置に関し、特に、被検液中の複数の検出目的物質を一度に簡易に測定可能な免疫クロマトグラフィー装置に関する。

【0002】

【従来の技術】被検液中の検出目的物質に免疫学的に結合する物質を用い、免疫反応とクロマトグラフィーの原理を組み合わせて、目的物質を検出する方法が、免疫クロマトグラフ法またはイムノクロマトグラフ法と呼ばれ、近年、広く用いられてきており、そのための装置も種々開発されている。

【0003】特開平8-5635号公報には、被検液中の複数の検出目的物質を一度に測定可能な免疫クロマトグラフィー装置が開示されている。この装置は、図3に示すものであり、図3(a)は、その平面図、図3(b)は、その断面図である。なお、この発明は複数の検出目的物質を一度に測定可能な装置であるが、図3は、二つの検出目的物質を一度に測定する例として示されたものであり、検出目的物質としては二つの抗原(説明の都合上、二つの抗原をそれぞれ第1の抗原と第2の抗原と呼ぶ)を例としている。抗体固相化支持体12上に第2抗体(第2の抗原に対応する抗体)固相化ゾーン15と第1抗体(第1の抗原に対応する抗体)固相化ゾーン16が形成されており、抗体固相化支持体12の一方側に接触して着色ラテックス粒子標識抗体凍結乾燥担体13が設けられ、着色ラテックス粒子抗体標識凍結乾燥担体13の上には被検液浸漬用担体14の一部が接触して設けられ、更に、抗体固相化支持体12の他の方

側に接触して吸水性担体11が設けられている。上記着色ラテックス粒子標識抗体凍結乾燥担体13には、第1の抗原に対応する抗体が着色ラテックス粒子に結合したものと、第2の抗原に対応する抗体が上記と異なる色に着色された着色ラテックス粒子に結合したものとが含まれている。

【0004】この装置を使用して、被検液中に含まれる第1の抗原と第2の抗原を一度に検出するには、以下のようにして行う。被検液を、被検液浸漬用担体14に接触させ、毛細管現象により被検液を吸い上げ、被検液を被検液浸漬用担体14-着色ラテックス粒子標識抗体凍結乾燥担体13-抗体固相化支持体12-吸水性担体11の経路で展開せしめる。まず、被検液と着色ラテックス粒子標識抗体凍結乾燥担体とが接触すると、被検液中の第1の抗原は、該抗原に対応する抗体(着色ラテックス粒子に結合されている)と結合し、被検液中の第2の抗原は、該抗原に対応する抗体(異なる色に着色された着色ラテックス粒子に結合されている)と結合してそれぞれ複合体が形成される。次いで、この(着色ラテックス粒子が結合された)複合体は抗体固相化支持体12へ展開され、第1抗体固相化ゾーン16に達すると、第1の抗原と該抗原に対応する抗体との複合体がこの第1抗体に結合して固定され、この位置に着色ラテックス粒子の色が現れる。次いで、第2抗体固相化ゾーン15に達すると、第2の抗原と該抗原に対応する抗体との複合体がこの第2抗体に結合して固定され、この位置に先の着色と異なる着色ラテックス粒子の色が現れる。以上により、被検液中に含まれる第1の抗原と第2の抗原を一度に検出することが可能となる。

【0005】しかしながら、この装置は、①複数の検出目的物質の検出が同一展開経路の上でなされるので、検出位置が展開方向の下流にあるものほど測定のバラツキが大きくなる、②第1の検出目的物質と第2(又はそれ以上)の検出目的物質を独立して測定(定量)できない、③検出目的物質の数が増え、検出位置が増えれば増えるほど、抗体固相化支持体12の長さが長くなり、判定に要する時間が長くなる、という問題点があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記問題点を解決するためになされたものであり、特に、被検液中の複数の検出目的物質を一度に正確かつ簡易に測定可能な免疫クロマトグラフィー装置を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の免疫クロマトグラフィー装置は、被検液を吸収するための吸収パッドA、並びに、被検液中の検出目的物質に免疫学的に結合する物質が結合された視認可能な粒子が乾燥担持されたコンジュゲートパッドB及び検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉する部位を有する多孔性のクロマ

トグラフィー用部材Cが接触されてなるクロマトグラフィーの展開経路Dから構成され、上記展開経路Dが複数個別々に設けられており、吸収パッドAとそれぞれの展開経路D中のコンジュゲートパッドBが接触されていることを特徴とする。

【0008】請求項2記載の免疫クロマトグラフィー装置は、更に、クロマトグラフィー用部材Cから被検液を吸収するための吸収パッドEが、クロマトグラフィー用部材Cに接触されて設けられていることを特徴とする請求項1記載の免疫クロマトグラフィー装置である。

【0009】請求項3記載の免疫クロマトグラフィー装置は、上記構成部材の少なくとも一部を収容するハウジングが備えられていることを特徴とする請求項1又は2記載の免疫クロマトグラフィー装置である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】本発明において、被検液中の検出目的物質とは抗原または抗体を指し、検出目的物質に免疫学的に結合する物質とは、検出目的物質が抗原である場合には抗体、検出目的物質が抗体である場合には抗体又は抗原を指すものである。

【0011】本発明の免疫クロマトグラフィー装置において、被検液を吸収するための吸収パッドAは、複数個別々に設けられた、それぞれのクロマトグラフィー展開経路D中のコンジュゲートパッドBに接触されている必要がある。この場合、一つの吸収パッドAが全てのコンジュゲートパッドBに接触されていてもよいし、複数の吸収パッドAが設けられて、個別にコンジュゲートパッドBに接触されていてもよい。

【0012】吸収パッドAとコンジュゲートパッドBの接触方法は、例えば、熱融着、テープ等による接着、ハウジングによる押圧力のような物理的接触、及び、これらの方法の併用などが挙げられる。熱融着の場合は、吸収パッドAとコンジュゲートパッドBのそれぞれの細孔が全面にわたって潰れてしまわないように、部分的に融着される。吸収パッドAの材質は、吸水性の材質であって、極度に保水機能のある（例えば、吸水によってゲル化するようなもの）材質のものではなく、水に溶けず、吸水時の強度があるものであれば、特に限定されないが、例えば、紙（セルロース）、不織布が挙げられる。

【0013】本発明の免疫クロマトグラフィー装置において、クロマトグラフィーの展開経路Dは、被検液中の検出目的物質に免疫学的に結合する物質が結合された視認可能な粒子が乾燥担持されたコンジュゲートパッドB及び検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉する部位を有する多孔性のクロマトグラフィー用部材Cが接触されてなるものである。上記展開経路Dは、複数個設けられ、それぞれは別々に設けられている。すなわち、展開経路Dは、D1、D2、D3、…のように複数個別々に設けられ、展開経路Dの数に等しく、コンジュゲートパッドBも、B1、B2、B3、…のように複

数個、及び、クロマトグラフィー用部材Cも、C1、C2、C3、…のように複数個設けられている。複数個の展開経路Dは、互いに、接触しないようにされることが必要であり、互いに十分距離を取るように構成するか、必要により、隣り合う展開経路D間にクロマトグラフィーの展開剤を通さないような仕切りが設けられてもよい。上記仕切りの形成法としては、例えば、フィルムのようなものを用いて仕切るのが一般的であるが、他に、隣り合う展開経路を形成する前の展開経路用部材に熱や圧力などを加えて、その部分の展開経路用部材の細孔を塞ぐことにより仕切りとし、その仕切りを挟んで隣り合う展開経路が形成されるようにしてもよい。

【0014】上記コンジュゲートパッドBとクロマトグラフィー用部材Cの接触方法は、例えば、熱融着、テープ等による接着、ハウジングによる押圧力のような物理的接触、及び、これらの方法の併用などが挙げられる。コンジュゲートパッドBの材質はグラスファイバー、紙（例、セルロースフィルター）、親水処理ポリプロピレンフィルターなどの親水性の多孔質材料が挙げられる。

【0015】上記コンジュゲートパッドBには、被検液中の検出目的物質に免疫学的に結合する物質が結合された視認可能な粒子（以下、粒子標識免疫結合性物質というときがある）が乾燥担持されている。上記視認可能な粒子としては、例えば、着色ラテックス粒子、コロイド状金属粒子、コロイド状金属酸化物粒子などが挙げられるが、色調の多様性やクロマトグラフィー展開後の発色の鮮明さを考慮すると着色ラテックス粒子が好ましい。上記着色ラテックス粒子の粒子径としては直径0.15～0.45μmが好ましい。色調は各展開経路D1、D2、D3、…ごとに変更してもよい。展開経路ごとに変更する場合は、例えば、ブルー、レッド、グリーンなどの任意の色を選択することができる。

【0016】上記粒子標識免疫結合性物質を得るには、検出目的物質に免疫学的に結合する物質を、視認可能な粒子に、物理的な結合又は化学結合で結合させればよい。この場合、非特異的な結合をしない点から化学結合の方がより好ましい。コンジュゲートパッドに上記粒子を乾燥担持させる方法は、上記粒子を溶媒に分散させたものを、該パッドに滴下した後、溶媒を気化させる方法が挙げられ、溶媒を気化させる方法としては、例えば、凍結乾燥や風乾が挙げられる。

【0017】クロマトグラフィー用部材Cの材質は、毛細管現象を起す作用を有し、粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質との結合生成物である複合体が免疫クロマトグラフィー用展開剤（例えば、血液（成分）、尿、水、緩衝液など）で速やかに拡散・移動できるような材質であれば、特に限定されず、例えば、ニトロセルロース、フッ化ビニリデン樹脂、ナイロン、ガラス繊維などからなるシート；及び涙紙等の多孔質体もしくはそれらの改質体が挙げられる。クロマトグラフィー用部材Cに

は必要に応じて裏打ちをいれてもよい。

【0018】クロマトグラフィー用部材Cは、検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉する部位を有するようにされている。検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉するとは、粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質との結合生成物である複合体を捕捉することを意味し、このために、クロマトグラフィー用部材C上的一部分に、上記複合体を構成する検出目的物質に免疫学的に結合する物質が固定化されている。クロマトグラフィー用部材C上的一部分に、上記検出目的物質に免疫学的に結合する物質を固定化するには、クロマトグラフィー用部材C上の任意の位置に上記結合する物質を塗布又はスプレーで散布して固相化すればよい。固相化の形によって、この免疫クロマトグラフィー装置を使用したときの標示の形がきまるが、スポット状(●)やストリーク状(—)の標示が簡単明瞭である。上記の標示の原理は検出目的物質が被検液中に存在した場合に、検出目的物質とコンジュゲートパッド中の粒子標識免疫結合性物質との複合体がクロマトグラフィー用部材C中をクロマト展開剤と共に流れ、上記の検出目的物質に免疫学的に結合する物質が固相化された位置で捕捉され、これによりその位置に粒子による発色(着色ラテックス粒子を用いた場合)などの視認可能な標示がみられることによる。

【0019】クロマトグラフィー用部材C上の、上記検出目的物質に免疫学的に結合する物質が固定化されている位置より展開方向下流の位置には、必要に応じて、粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質を介さずに結合する物質を固定化してもよい。このようにすると、粒子標識免疫結合性物質がこの位置で捕捉されて粒子による標示が視認されるので、測定が終了したことを示す指標となる。粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質を介さずに結合する物質とは、例えば、粒子標識免疫結合性物質の免疫結合性物質がマウスから產生された抗体である場合であれば、抗マウスIgG抗体が挙げられる。

【0020】本発明の免疫クロマトグラフィー装置には、必要に応じて、更に、クロマトグラフィー用部材Cから被検液を吸収するための吸収パッドEが、クロマトグラフィー用部材Cに接触されて設けられてもよい。吸収パッドEは、一つの吸収パッドEが全てのクロマトグラフィー用部材C1、C2、C3、…に接触されてもよいし、複数の吸収パッドEが設けられて、個別にクロマトグラフィー用部材Cに接触されてもよい。吸収パッドEは、クロマトグラフィー用部材Cから被検液を吸い上げることにより、クロマトグラフィー用部材Cに被検液をより多く流れさせるものであり、感度を上げる効果がある。吸収パッドEの大きさは、クロマトグラフィー用部材Cに流そうとする被検液の量によって決定される。吸収パッドの材質は、前述の吸収パッドAの説明で述べた材質と同じものが挙げられる。

【0021】本発明の免疫クロマトグラフィー装置に

は、必要に応じて、その構成部材の少なくとも一部を収容するハウジングが備えられていてもよい。上記ハウジングが設けられる目的は、①検出部位等に直接手で触れたりすることのないようにするため、②吸収パッドA、コンジュゲートパッドB、クロマトグラフィー用部材C及び吸収パッドEなどを最適の位置に固定するためなどである。ハウジングの構造例としては、通常、コンジュゲートパッドB、クロマトグラフィー用部材C及び吸収パッドEの部分を覆い、検出部位のみ(クロマトグラフィー用部材C上の捕捉された粒子による標示部分。必要に応じて設けられた測定終了の標示部分も含む)が透明フィルムなどで見える構造にし、吸収パッドAは被検液添加のために一部がハウジングの外に出ているように構成した例が挙げられる。また、キャップが設けられたハウジングとし、免疫クロマトグラフィー装置の使用前は、吸収パッドA、コンジュゲートパッドB、クロマトグラフィー用部材C及び吸収パッドEの全てが覆われていて、使用時にキャップを取り外し吸収パッドAを露出させて被検液の添加を行えるように構成されてもよい。ハウジングの材質は、変形しにくく、ある程度の強度を持っているものであれば、特に限定されないが、例えば、プラスチックが挙げられる。

【0022】以下、図によって本発明を更に説明する。図1(イ)～(ホ)は、本発明の免疫クロマトグラフィー装置の構成例を模式的に示す平面図であり、これらは3つの展開経路D1、D2、D3をもつ場合の例であり、展開経路D1はコンジュゲートパッドB1とクロマトグラフィー用部材C1とからなり、展開経路D2はコンジュゲートパッドB2とクロマトグラフィー用部材C2とからなり、展開経路D3はコンジュゲートパッドB3とクロマトグラフィー用部材C3とからなり、図1(ロ)、図1(ハ)、図1(ホ)に示すものは、吸収パッドAが一つ設けられて、それがコンジュゲートパッドB1、B2、B3に同時に接觸している例であり、図1(ハ)、図1(ニ)に示すものは、吸収パッドEが一つ設けられて、それがクロマトグラフィー用部材C1、C2、C3に同時に接觸している例である。図における矢印はクロマトグラフィーの展開方向である。図1(イ)～(ホ)に示した符号1は、ハウジングを示すものであり、各部材がハウジング1内に収容されていることを模式的に示すものである。

【0023】図2は、本発明の免疫クロマトグラフィー装置の一実施の形態の要部を示すものであり、図2(イ)は、その平面図、図2(ロ)は、その側面図である。この免疫クロマトグラフィー装置は、2つの展開経路D1、D2を有するものである。クロマトグラフィーの展開方向は図に示した矢印方向である。クロマトグラフィー用部材C1とC2が一定の距離をおいて設けられ、クロマトグラフィー用部材C1上には、検出目的物質に免疫学的に結合する物質F1が固定化され、該物質

F1の位置よりも展開方向下流には粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質を介さずに結合する物質G1が固定化され、クロマトグラフィー用部材C2上には、他の検出目的物質に免疫学的に結合する物質F2が固定化され、該物質F2の位置よりも展開方向下流には他の粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質を介さずに結合する物質G2が固定化されている。上記クロマトグラフィー用部材C1、C2の展開方向上流側には、それぞれコンジュゲートパッドB1、B2の一部が重ねられている。また、それぞれのコンジュゲートパッドB1、B2には、それぞれ粒子標識免疫結合性物質が乾燥担持されている。

【0024】更に、上記コンジュゲートパッドB1、B2の他部には、一つの吸収パッドAが重ねられている。上記クロマトグラフィー用部材C1、C2の展開方向下流側には、一つの吸収パッドEが重ねられている。

【0025】なお、図示しないが、上記各部材からなる免疫クロマトグラフィー装置は、吸収パッドAの一部を除いて、ハウジングに収容されており、クロマトグラフィー用部材の上記物質F1、G1、F2及びG2が固定化された位置に対応するハウジングの部分には、窓が開けられている。

【0026】以上述べた免疫クロマトグラフィー装置においては、粒子標識免疫結合性物質が乾燥担持されたコンジュゲートパッドB及び検出目的物質を介して視認可能な粒子を捕捉する部位を有する多孔性のクロマトグラフィー用部材Cが接触されてなるものであったが、上記の粒子標識免疫結合性物質はコンジュゲートパッドBに担持されずにクロマトグラフィー用部材Cに直接担持されてもよい。この場合は、該粒子が分散された液をクロマトグラフィー用部材Cに添加するときに、該粒子がクロマトグラフィー用部材上で展開されないように、液量を十分少なくする必要がある。この条件を満足すれば、このような構成の免疫クロマトグラフィー装置においても、本発明の効果を満足するので、この構成も本発明に含まれるものとする。

【0027】

【実施例】以下に本発明の実施例を掲げて更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0028】実施例1

上記図2に示した構成（ただし、上記物質G1及びG2の固定化は省かれており、さらに吸収パッドEは2個設けられている）の免疫クロマトグラフィー装置を以下のようにして作製した。

1) クロマトグラフィー用部材C1、C2の作製
ハイフローTMメンブレン（Millipore社製、SRHF）を5mm×40mmに裁断し、その右端より10mmの位置に抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体溶液0.5mg/ml（日本バイオテスト社製）を、

エアーブラシ（オリンパス社製）を用いて幅2mmに塗布し、室温で2時間乾燥して抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体F1のラインを作製した。次いで、1重量%スキムミルク（DIFCO社製）-0.1重量%Tween20を含むPBS（リン酸生理食塩液）に37℃で2時間浸漬し、十分マスキングを行った。その後、十分に乾燥し抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体F1の固相化ラインが形成されたクロマトグラフィー用部材C1を作製した。

【0029】上記抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体溶液0.5mg/ml（日本バイオテスト社製）の代わりに、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体溶液0.5mg/ml（日本バイオテスト社製）を用いた他は、上記と同様に操作してヒトアルブミンモノクローナル抗体F2の固相化ラインが形成されたクロマトグラフィー用部材C2を作製した。

【0030】2) 着色ラテックス粒子標識抗体の調製
a. ブルーラテックス粒子標識抗ヒトヘモグロビン抗体
ブルーラテックス粒子分散液（カラーラテックスC-300B、1.0重量%、直径300nm、積水化学工業社製）300μlにPBS1.2mlを加え、15000rpm、5分間遠心分離を行った。沈査に抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体（前述の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体F1とは、ヒトヘモグロビンの別の部位を認識する）溶液（0.5mg/ml）（日本バイオテスト社製）1mlを加え、十分混和して、室温、1時間反応を行った。未反応の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を除去するため、15000rpm、5分間遠心分離を行い、沈査をPBS1.5mlに懸濁させ再度遠心分離を行った。4重量%ブロックエース（明治乳業社製）1mlを加え、室温、60分間反応させてマスキングを行った。その後、15000rpm、5分間遠心分離を行い、沈査を1重量%スキムミルク（DIFCO社製）-0.01重量%アジ化ナトリウムを含むPBS1.5mlに懸濁させ冷凍保存した。

【0031】b. レッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミン抗体

ブルーラテックス粒子分散液及び抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体溶液の代わりに、レッドラテックス粒子分散液（カラーラテックスC-300R、1.0重量%、直径300nm、積水化学工業社製）及び抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（前述の抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体F2とは、ヒトアルブミンの別の部位を認識する）（0.5mg/ml）（日本バイオテスト社製）を用いた他は、上記a. と同様に操作してレッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミン抗体を調製した。

【0032】3) コンジュゲートパッドB1及びB2の作製

上記a. で作製したブルーラテックス粒子標識抗ヒトヘ

モグロビン抗体をベンリーゼTM不織布（旭化成社製）幅5mm×長さ10mmに10μl含浸させ凍結乾燥してコンジュゲートパッドB1を調製した。上記b.で作製したレッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミン抗体をベンリーゼTM不織布（旭化成社製）幅5mm×長さ10mmに10μl含浸させ凍結乾燥してコンジュゲートパッドB2を調製した。

【0033】4) 免疫クロマトグラフィー装置の作製
コンジュゲートパッドB1の右端5mmをクロマトグラフィー用部材C1の左端と重ね、テープで固定した。次に、該クロマトグラフィー用部材C1の右端と吸収パッドE1（No. 526、アドバンテック東洋社製）幅5mm×長さ15mmの左端5mmを重ねテープで固定した。同様に、コンジュゲートパッドB2の右端5mmをクロマトグラフィー用部材C2の左端と重ね、テープで固定した。次に、該クロマトグラフィー用部材C2の右端と吸収パッドE2（No. 526、アドバンテック東洋社製）幅5mm×長さ15mmの左端5mmを重ねテープで固定した。このように、コンジュゲートパッド及び吸収パッドが固定されたクロマトグラフィー用部材C1及びC2を吸収パッドA（No. 526、アドバンテック東洋社製）12mm×30mmの幅12mmの部分に、5mm幅のクロマトグラフィー用部材C1及びC2の間隔が2mmとなるように、また吸収パッドAの右端5mmとコンジュゲートパッドB1、B2の左端が重なるようにテープで固定した。このようにして得られたものを、吸収パッドAの先端20mmが露出するようにして残りの部分をハウジングで覆い免疫クロマトグラフィー装置とした。

一装置とした。

【0034】5) 標準液を用いた反応性試験

ヒトアルブミン（結晶、生化学工業社製）を30μg/ml、ヒトヘモグロビン（2回結晶、Sigma社製）を0.15μg/mlになるように各々PBSに溶解し2種の標準液を調製した。標準液200μlを免疫クロマトグラフィー装置の吸収パッドAの露出部に滴下、展開した。5分後、クロマトグラフィー用部材上の固相化した前記抗体F1のライン部分及び前記抗体F2のライン部分の着色の有無により判定を行った。ヒトアルブミン標準液では赤色のラインのみ、ヒトヘモグロビン標準液では青色のラインのみが検出された。2種の標準液を混合したものでは赤色、青色双方のラインが検出され、対照としてPBSのみを滴下、展開したものでは、着色ラインはみられず非特異発色は無かった。

【0035】また、従来技術との比較のために、特開平8-5635号公報に記載された実施例1と同様にして（ただし、ブルーラテックス粒子標識抗ヒトヘモグロビン抗体及びレッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミン抗体は、本発明で作成したものを用いた）免疫クロマトグラフィー装置を作製し、上記と同様にして着色の判定を行った。その結果、従来技術の免疫クロマトグラフィー装置では、本発明の発色に比べて、展開下流の位置にある検出ラインの発色が薄かった。以上の試験結果をまとめて表1に示した。

【0036】

【表1】

	本発明		従来技術	
	赤	青	赤（展開下流）	青（展開上流）
ヒトヘモグロビン標準液	-	+	-	+
ヒトアルブミン標準液	+	-	+	-
ヒトヘモグロビン・ヒトアルブミン混合液	+	+	±	+
対照（PBS）	-	-	-	-

+ 鮮明な発色 ± 発色が薄い - 発色なし

【0037】

【発明の効果】本発明の免疫クロマトグラフィー装置を用いると、①第1の検出目的物質と第2の検出目的物質が独立して測定（定量）できる、②測定項目が増えれば増えるほど、従来法では展開位置が下流にある測定項目の測定のバラツキが大きくなるが、本発明によれば項目が増えても反応阻害は起きない、③クロマトグラフィー用部材を長くする必要がないので判定に要する時間が短い、④終了反応が項目ごとに個別にでるため、定量測定の際に比較し易い、⑤従来の免疫クロマトグラフィー装置で、1装置1項目を検出するタイプものに比べると測定の手間が少なくてすむ、⑥一つの検出目的物質を測定

するときには、検出感度を2種類以上変えて一度に測定できる（着色ラテックス粒子標識免疫学的結合物質をコンジュゲートパッドに含浸させる量を変えることにより、発色の度合いを変えることができる希釈系列を測定するのと同様の測定が1回で可能である）、などの利点がある。本発明によれば、特に、被検液中の複数の検出目的物質を一度に正確かつ簡単に測定可能な免疫クロマトグラフィー装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の免疫クロマトグラフィー装置の構成例を模式的に示す平面図である。

【図2】図2は、本発明の免疫クロマトグラフィー装置

の一実施の形態の要部を示す図であり、図2(イ)は、その平面図、図2(ロ)は、その側面図である。

【図3】特開平8-5635号公報に記載された従来の免疫クロマトグラフィー装置の構成を示す図である。

【符号の説明】

A、A1、A2、A3 吸収パッド

B1、B2、B3 コンジュゲートパッド

C1、C2、C3 クロマトグラフィー用部材

D1、D2、D3 展開経路

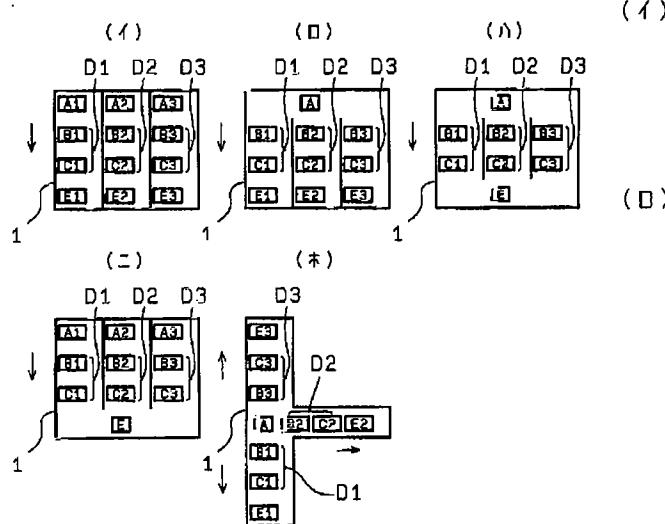
E、E1、E2、E3 吸収パッド

F1、F2 検出目的物質に免疫学的に結合する物質

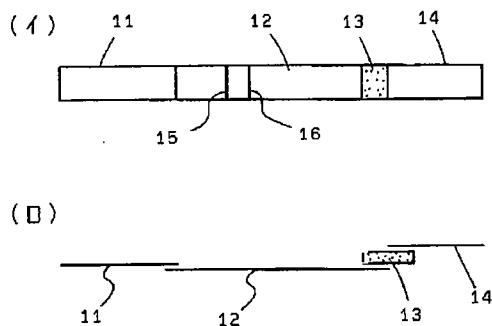
G1、G2 粒子標識免疫結合性物質と検出目的物質を介さずに結合する物質

1 ハウジング

【図1】



【図3】



【図2】

